

Karakterisasi Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) Menggunakan LC-MS dan Pengaruhnya terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Terpapar *Multiple Low Dose-Streptozotocin* (MLD-STZ)

SKRIPSI

oleh:

ISTORIA ROSYADA

145090201111032



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

Karakterisasi Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) Menggunakan LC-MS dan Pengaruhnya terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Terpapar *Multiple Low Dose-Streptozotocin* (MLD-STZ)

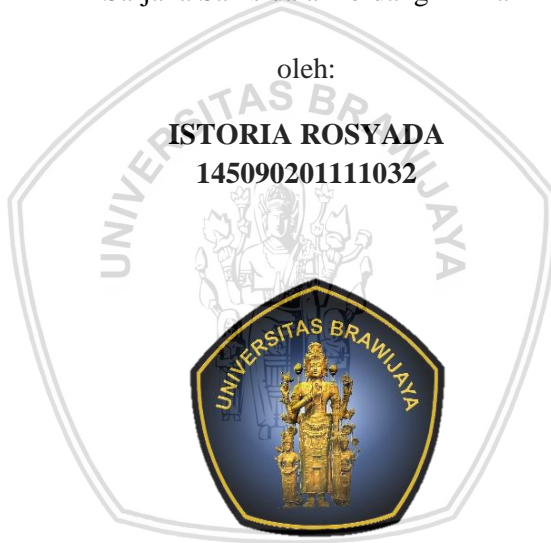
SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

oleh:

ISTORIA ROSYADA

145090201111032



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Karakterisasi Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) Menggunakan LC-MS dan Pengaruhnya terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Terpapar Multiple Low Dose-Streptozotocin (MLD-STZ)

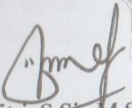
oleh:

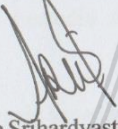
ISTORIA ROSYADA
145090201111032

Setelah diseminarkan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 17 JUL 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

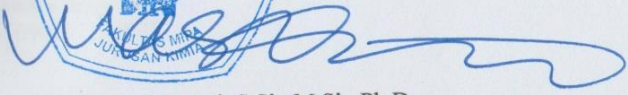
Pembimbing I

Pembimbing II


Anna Safitri, S.Si., M.Sc., Ph.D
NIP 198008132005022008


Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes
NIP 197203262002122001

Mengetahui Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya


Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D
NIP 197310202002121001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Istoria Rosyada
NIM : 145090201111032
Jurusan : Kimia
Penulis skripsi berjudul:

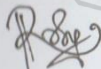
"Karakterisasi Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) Menggunakan LC-MS dan Pengaruhnya terhadap Kadar Glukosa darah Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Terpapar *Multiple Low Dose-Streptozotocin* (MLD-STZ)"

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termasuk di isi dan tertulis didaftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila terbukti dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti jiplakan, maka saya bersedia menanggung segala resiko yang saya terima.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran.

Malang, Juli 2018
Yang menyatakan,



(Istoria Rosyada)
145090201111032

Karakterisasi Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) Menggunakan LC-MS dan Pengaruhnya terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Terpapar *Multiple Low Dose-Streptozotocin* (MLD-STZ)

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi terapi dari ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) untuk pengobatan DM pada hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) akibat induksi MLD-STZ. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok, yakni kontrol negatif, kontrol positif, kelompok terapi 250 mg/kg BB, 375 mg/kg BB, dan 500 mg/kg BB dengan lama terapi 21 hari yang dilakukan secara oral. Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah karakterisasi ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) menggunakan LC-MS dan kadar glukosa darah tikus putih (*Rattus norvegicus*). Karakterisasi ekstrak dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang berfungsi sebagai antioksidan. Sedangkan pengukuran kadar glukosa darah tikus dilakukan menggunakan glukometer *digital*. Hasil karakterisasi ekstrak menunjukkan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol akar pletekan adalah senyawa fitosterol (β -sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol). Pada hasil penelitian menunjukkan penurunan kadar glukosa darah sebesar 54,56% (dosis terapi 250 mg/kg BB), 37,70% (dosis terapi 375 mg/kg BB), dan 16,79% (dosis terapi 500 mg/kg BB).

Kata kunci: diabetes melitus (DM), *Ruellia tuberosa* L., LC-MS, fitosterol, kadar glukosa darah

Characterization of Ethanol Root Extract Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) using LC-MS and the Influence on Blood Glucose Levels of Rats (*Rattus norvegicus*) that Exposed Multiple Low Dose-Streptozotocin (MLD-STZ)

ABSTRACT

The aim of this research is to determine the effects of ethanol root extract pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) for treatment of DM in white rat test animal (*Rattus norvegicus*) induced by MLD-STZ. The rats were divided into 5 groups, ie negative control, positive control, treatment group 250 mg/kg BW, 375 mg/kg BW, and 500 mg/kg BW with 21 days of oral therapy. The parameters observed in this study were characterization of ethanol root extract pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) using LC-MS and blood glucose level of white rat (*Rattus norvegicus*). Characterization of the extract was conducted to determine the content of secondary metabolite compounds that function as antioxidants. The measurement of blood glucose levels of rats performed using a digital glucometer. The result of characterization of extract showed that the secondary metabolite compounds contained in ethanol root extract pletekan are phytosterol compound (β -sitosterol, stigmasterol, and campesterol). The results showed decrease in blood glucose levels by 54.56% (dose therapy 250 mg/kg BW), 37.70% (dose therapy 375 mg/kg BW), and 16.79% (dose therapy 500 mg/kg BW).

Key words: diabetes mellitus (DM), *Ruellia tuberosa* L., LC-MS, phytosterol, blood glucose levels

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, berkah, dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Karakterisasi Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) Menggunakan LC-MS dan Pengaruhnya terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus (*Rattus norvegicus*) yang terpapar *Multiple Low Dose-Streptozotocin* (MLD-STZ)**” ini sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia, FMIPA, Universitas Brawijaya, Malang. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW dan ummatnya hingga akhir zaman.

Penyusunan skripsi ini tidak dapat terselesaikan dengan baik tanpa bantuan dan kerja sama dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Anna Safitri, S.Si., M.Sc., Ph.D, Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes, dan Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc selaku dosen pembimbing yang telah membimbing, memberikan pengetahuan, dukungan dan masukan kepada penulis selama penyusunan skripsi.
2. Dra. Sri Wardhani, M.Si selaku dosen penasehat akademik yang telah memberikan arahan, dukungan serta nasehat selama masa studi.
3. Dosen penguji seminar proposal, kemajuan dan tugas akhir atas saran kepada penulis.
4. Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D selaku Ketua Jurusan Kimia beserta segenap Staf Pengajar dan Karyawan Jurusan Kimia.
5. Bapak Kartadji, Ibu Nurati, Kakak Yanuar Abdhan, dan Adik Fajriantika N. Auliya beserta seluruh keluarga yang selalu mendo'akan dan memberikan kasih sayang dan semangat serta dukungan moril dan materil.
6. Bapak Maryono selaku laboran Biokimia yang telah membantu dalam penyediaan alat dan kebutuhan selama penelitian.
7. Tim Ekstrak Pletekan (Pretty Septiana, Ningrum Arrochmah, Cindy Alvionita E., Siti Sumadyah N.A., Zulfatul Muzayyana,

- dan Resti Rachmawanti) yang telah membantu dan memberikan dukungan selama pelaksanaan penelitian.
8. Teman-teman laboratorium Biokimia (Mbak Dolly Irnawati N., Mbak Majida, M. Hafid B., dan Shofiatul H.) atas dukungannya selama pelaksanaan penelitian.
 9. Rekan-rekan dari Fakultas Kedokteran Hewan (Intan Kirana I., Riera Indah, Dhiya Ulfa G., dan Khoirul Ummam) atas segala dukungan dan kerjasamanya.
 10. Suci Susanti, Ridha Dhini R., Asyfarriatus Zulfa A., Denis Al Karoma, Demara Meilia, Fify Nuryati, Firanda Andy, Anindya Nurul C., Dianisari Sofia R. dan juga teman-teman dari Kimia B 2014, COLT 2015, Kimia Angkatan 2014, PKM Edible Film, serta berbagai pihak yang telah mendukung penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penulisan, mohon maaf apabila terdapat kesalahan, semoga skripsi ini dapat memberi manfaat dan pengetahuan yang dibutuhkan oleh pembaca.

Malang, Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH, LAMBANG, dan SINGKATAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
1.1 Diabetes Mellitus	7
1.2 Pletekan (<i>Ruellia tuberosa</i> L.)	8
1.3 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	9
1.4 Kadar Glukosa Darah	10
1.5 Senyawa Fitosterol Sebagai Antioksidan Alami	11
1.6 Streptozotocin	13
1.7 Karakterisasi LC-MS	15
1.8 Hipotesis Penelitian	15
BAB III METODE PENELITIAN	17
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	17
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	17
3.2.1 Alat Penelitian	17
3.2.2 Bahan Penelitian	17
3.3 Tahapan Penelitian	17
3.4 Prosedur Penelitian	18
3.4.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Akar Pletekan dan Penentuan Dosis Terapi	18

3.4.2 Karakterisasi Ekstrak Etanol Akar Pletekan dengan Instrumentasi LC-MS	18
3.4.3 Persiapan Hewan Uji	19
3.4.4 Pembuatan Larutan dan Injeksi STZ secara IP serta Inkubasi Hewan Uji	19
3.4.5 Pengukuran Kadar Glukosa Darah dengan Glukometer	20
3.4.6 Terapi Hewan Uji dengan Ekstrak Etanol Akar Pletekan secara Oral	20
3.4.7 Analisa Data	20
BAB IV PEMBAHASAN	21
4.1 Hasil Ekstraksi Etanol Akar Pletekan (<i>Ruellia tuberosa</i> L.)	21
4.2 Karakterisasi Ekstrak Etanol Akar Pletekan (<i>Ruellia tuberosa</i> L.) Menggunakan LC-MS	21
4.3 Pengaruh Ekstrak Etanol Akar Pletekan (<i>Ruellia tuberosa</i> L.) terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Model Diabetes Mellitus Tipe 1 Akibat Induksi MLD-STZ	24
BAB V PENUTUP	31
5.1 Kesimpulan	31
5.2 Saran	31
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	41

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	: Intrepetasi hasil LC-MS untuk senyawa fitosterol	23
Tabel 4.2	: Kadar glukosa darah tikus kontrol negatif, kelompok positif, kelompok terapi 250 mg/kg BB, 375 mg/kg BB, dan 500 mg/kg BB	25



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.2	: Tanaman Pletekan (<i>Ruellia tuberosa</i> L.)	8
Gambar 2.3	: <i>Rattus norvegicus</i> galur Wistar	10
Gambar 2.5.1	: Struktur Kimia Stigmasterol	12
Gambar 2.5.2	: Struktur Kimia β -sitosterol	12
Gambar 2.5.3	: Struktur Kimia Kampesterol	12
Gambar 2.6	: Struktur Kimia Streptozotocin	14
Gambar 4.1	: Kromatogram dugaan senyawa kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol	22
Gambar 4.2	: Struktur kimia Stigmasterol	23
Gambar 4.3	: Struktur kimia β -sitosterol	24
Gambar 4.4	: Struktur kimia kampesterol	24
Gambar 4.5	: Mekanisme pembentukan radikal bebas NO oleh STZ	26
Gambar 4.6	: Prediksi mekanisme reaksi senyawa stigmasterol dalam meredam radikal bebas	27
Gambar 4.7	: Prediksi mekanisme reaksi senyawa β -sitosterol dalam meredam radikal bebas	28
Gambar 4.8	: Prediksi mekanisme reaksi senyawa kampesterol dalam meredam radikal bebas	29

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A.	Sertifikat Laik Etik	41
Lampiran B.	Surat Determinasi Tanaman Akar Pletekan (<i>Ruellia tuberosa</i> L.)	42
Lampiran C.	Tahapan Penelitian secara Umum	43
Lampiran D.	Data Pengukuran Kadar Glukosa darah	44
Lampiran E.	Perhitungan dan Preparasi Larutan	46
E.1	Pembuatan Larutan Asam Sitrat 0,2 M	46
E.2	Pembuatan Larutan Natrium Sitrat 0,2 M	46
E.3	Pembuatan Larutan Buffer Sitrat pH 4,5	46
E.4	Perhitungan Dosis Larutan STZ	47
E.5	Perhitungan Dosis Terapi Ekstrak Etanol Akar Pletekan	47
E.5.1	Dosis Terapi 250 mg/kg BB	47
E.5.2	Dosis Terapi 375 mg/kg BB	47
E.5.3	Dosis Terapi 500 mg/kg BB	47
Lampiran F.	Hasil Uji Statistika	48
F.1	Uji Homogenitas	48
F.2	Uji Statistika ANOVA	48
F.3	Uji BNJ (Beda Nyata Jujur)	49
F.4	Pemberian Notasi pada Uji BNJ	49
Lampiran G.	Foto Penelitian	50

DAFTAR ISTILAH, LAMBANG dan SINGKATAN

Singkatan	Keterangan
DM	(Diabetes Mellitus)
WHO	(<i>World Health Organization</i>)
ROS	(<i>Reactive Oxygen Species</i>)
GLUT	(<i>Glucose Transporter</i>)
STZ	(<i>Streptozotocin</i>)
LC-MS	(<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
Anti-GAD	(<i>anti-Glutamic Acid Decarboxylase</i>)
DNA	(<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
SOD	(<i>Superoksida Dismutase</i>)
NO	(<i>Nitrat Oksida</i>)
pH	(<i>Potensial Hidrogen</i>)
ATP	(<i>Adenosin Tri Posfat</i>)
HPLC	(<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IP	(<i>Intraperitoneal</i>)
ANOVA	(<i>Analysis of Variance</i>)
BNJ	(<i>Beda Nyata Jujur</i>)

Simbol	Keterangan
α	Alfa
β	Beta
mg/dL	Mili gram/desi liter
mg/kg BB	Mili gram/kilo gram berat badan
mL	Mili liter
mg	Mili gram
μ L	Mikro liter
μ L/min	Mikro liter/menit
g	Gram
mm	Mili meter
M	Molar
g/mol	Gram/mol
Δ	Delta
cm	Centi meter



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Berdasarkan data Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) pada tahun 2016, diabetes mellitus berada pada peringkat ke tujuh sebagai penyebab kematian kategori penyakit tidak menular. Internasional Diabetes Federation (2017) menyatakan bahwa jumlah penderita diabetes mellitus di seluruh dunia mencapai 425 juta jiwa. Indonesia sebagai negara berkembang berada pada peringkat ke enam negara dengan penderita diabetes terbanyak, yaitu sebesar 10 juta jiwa. Peringkat pertama adalah Cina dengan penderita diabetes sebesar 114 juta jiwa, diikuti oleh India (73 juta jiwa), Amerika Serikat (30 juta jiwa), Brasil (13 juta jiwa), dan Meksiko sebagai peringkat ke enam dengan jumlah penderita 12 juta jiwa [1,2]

Diabetes mellitus (DM) merupakan salah satu penyakit yang bersifat kronis bagi penderitanya. Diabetes mellitus ditandai dengan meningkatnya kadar glukosa darah dan adanya gangguan metabolisme zat makanan (karbohidrat, lemak, dan protein) yang disebabkan kerusakan pada sistem sekresi dan kerja hormon insulin [3]. Penyebab diabetes mellitus adalah rusaknya sel β pankreas yang berfungsi dalam produksi insulin dan atau karena reseptor insulin mengalami resistensi [4]. Insulin merupakan suatu hormon yang berfungsi mengatur kadar glukosa dalam darah. Timbulnya berbagai komplikasi pada organ tubuh terutama pankreas merupakan pertanda terjadinya gangguan produksi insulin. Pankreas merupakan suatu organ yang diindikasikan dengan peningkatan kadar glukosa dalam darah (hiperglikemia). Hiperglikemia merupakan indikator utama dari penyakit diabetes yang dapat menyebabkan masalah serius pada sistem tubuh, khususnya saraf dan pembuluh darah [5].

Kondisi hiperglikemia berkaitan dengan terjadinya stres oksidatif akibat produksi radikal bebas atau ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang berlebihan. Hal tersebut dikarenakan di dalam tubuh

jumlah radikal bebas lebih banyak daripada antioksidan. Radikal bebas di dalam tubuh merupakan penyebab kerusakan sel, khususnya sel β pankreas [6]. Selain itu, meningkatnya stres oksidatif berdampak pada berkurangnya jumlah GLUT (*glucose transporter*) yang akan menimbulkan peningkatan resistensi insulin, insulin *signaling* menjadi lemah serta terganggunya sekresi insulin oleh sel β pankreas [7]. Jumlah radikal bebas dalam tubuh yang terus meningkat dapat mengakibatkan permasalahan serius bagi tubuh, yaitu dapat menimbulkan komplikasi penyakit pada penderita diabetes [8]. Hal tersebut dikarenakan radikal bebas akan mengoksidasi senyawa lipid, protein dan aktivitas enzim mengalami penurunan [9]. Salah satu senyawa kimia yang dapat menyebabkan suatu hewan uji terpapar DM adalah *streptozotocin* (STZ). STZ dapat membentuk radikal bebas sangat reaktif yang mampu menyebabkan membran sel, protein, dan DNA mengalami kerusakan, sehingga kerja sel β pankreas untuk memproduksi insulin terganggu [10].

Kondisi stres oksidatif yang disebabkan adanya radikal bebas memerlukan jumlah antioksidan yang cukup untuk mengurangi kerusakan akibat radikal bebas [11]. Pemberian antioksidan dari luar tubuh sangat dibutuhkan untuk menangkal radikal bebas [12]. Salah satu alternatif pengobatan alami yang mempunyai khasiat tidak berbeda jauh dengan obat sintetik adalah berasal dari tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa* L.). *Ruellia tuberosa* L. diketahui mengandung senyawa metabolit sekunder jenis fitosterol, antara lain β -sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol. Senyawa fitosterol berpotensi sebagai antioksidan dan antiinflamasi dalam pengobatan diabetes mellitus. Selain itu, fitosterol bermanfaat dalam merangsang sekresi insulin dari pankreas [13,14]. Amri (2014), menambahkan bahwa ekstrak etanol 70% pletekan mempunyai aktivitas biologi yang dapat menghambat enzim α -glukosidase yang mengakibatkan kadar glukosa darah tidak terbentuk secara berlebihan, sehingga ekstrak etanol 70% pletekan berkhasiat sebagai antidiabetes [15].

Berdasarkan uraian diatas, tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) mempunyai khasiat sebagai antidiabetes. Namun belum ada penelitian yang memanfaatkan akar dari tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) sebagai antidiabetes. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) sebagai obat untuk penyakit diabetes mellitus. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol akar *Ruellia tuberosa* L. terhadap kadar glukosa darah pada hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) dan karakterisasi ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) menggunakan LC-MS untuk identifikasi senyawa metabolit sekunder fitosterol sebagai antioksidan alami pengobatan diabetes.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut:

1. Bagaimana karakteristik ekstrak etanol akar *Ruellia tuberosa* L. menggunakan LC-MS?
2. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak etanol akar *Ruellia tuberosa* L. terhadap kadar glukosa darah pada tikus model diabetes mellitus akibat induksi MLD-STZ?
3. Bagaimana pengaruh dosis terapi terhadap kadar glukosa darah tikus model diabetes mellitus akibat induksi MLD-STZ?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan uraian perumusan masalah, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Serbuk akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) diperoleh dari Materia Medica, Batu, Malang.
2. Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur Wistar yang diperoleh dari Institut Biosains Universitas Brawijaya Malang usia ± 2

bulan dengan kisaran berat badan rata-rata 200 gram yang telah mendapat persetujuan laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No: 873-KEP-UB (**Lampiran A**)

3. Dosis Streptozotocin yang digunakan adalah dosis rendah berulang (MLD-STZ). STZ diberikan sebanyak 20 mg/Kg bb/hari yang dilakukan selama 5 hari berturut-turut.
4. Akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) dimaserasi menggunakan pelarut etanol-akuades (1:1) selama 3x24 jam.
5. Karakterisasi ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) menggunakan LC-MS.
6. Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah kadar glukosa darah tikus dan pengaruh dosis terapi ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) yang diberikan.
7. Dosis terapi ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) yang digunakan adalah 250 mg/kg bb, 375 mg/kg bb, dan 500 mg/ kg bb.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. Mengetahui karakteristik ekstrak etanol akar *Ruellia tuberosa* L. menggunakan LC-MS.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol akar *Ruellia tuberosa* L. terhadap kadar glukosa darah tikus model diabetes mellitus akibat induksi MLD-STZ.
3. Mengetahui pengaruh dosis terapi terhadap kadar glukosa darah tikus model diabetes mellitus akibat induksi MLD-STZ.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu dapat memberikan informasi mengenai manfaat ekstrak etanol akar *Ruellia tuberosa* L. yang

berpotensi sebagai tanaman obat diabetes untuk manusia. Sehingga dapat digunakan sebagai salah satu produk herbal alternatif dan sebagai bahan dasar pembuatan obat untuk menurunkan kadar glukosa dalam darah.







BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Melitus (DM)

Diabetes merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh gangguan pada sistem metabolisme karbohidrat, lemak dan protein dalam tubuh. Gangguan sistem metabolisme tersebut disebabkan oleh berkurangnya produksi hormon insulin. Sel β di kelenjar pankreas menghasilkan hormon insulin yang berperan penting dalam metabolisme glukosa dalam tubuh. Hormon insulin diperlukan dalam proses pengubahan gula menjadi tenaga dan untuk sintesis lemak. Kadar insulin dalam tubuh dapat berkurang jika terjadi kerusakan kecil atau besar pada sel-sel β dalam kelenjar pankreas. Keadaan tersebut menyebabkan terjadinya hiperglikemia. Hiperglikemia adalah suatu kondisi dimana kadar gula dalam darah mengalami peningkatan atau adanya kandungan yang berlebih gula dalam air kencing dan zat-zat keton serta asam (*keto-acidosis*) [16,17].

Diabetes melitus atau sering disebut dengan *the great imitator*, yaitu suatu penyakit yang menyerang semua organ di dalam tubuh sehingga menimbulkan berbagai keluhan. Orang yang menderita diabetes melitus mengalami gejala-gejala, antara lain menjadi lebih banyak minum (*polidipsi*), sering buang air kecil (*poliuri*), dan sering merasa lapar (*polipagi*). *Polidipsi* dan *poliuri* disebabkan karena kadar glukosa yang berlebih dikeluarkan bersama urin melalui ginjal, dimana gula menarik air yang menyebabkan penderita diabetes banyak mengeluarkan urin dan sering merasa haus [17].

Diabetes melitus dapat diklasifikasikan menjadi 2 jenis utama berdasarkan sekresi insulin, yaitu diabetes melitus tipe 1 (diabetes melitus tergantung insulin) dan tipe 2 (diabetes melitus tidak tergantung insulin) [18]. DM tipe 1 disebabkan akibat proses kerusakan sel β , yang mana insulin dibutuhkan untuk bertahan hidup sebagai upaya mencegah terjadinya *ketoacidosis*. Tipe 1 ditandai dengan adanya anti-GAD, sel islet atau antibodi insulin yang mengidentifikasi proses autoimun yang menyebabkan kerusakan sel β . Sedangkan DM tipe 2 adalah jenis diabetes yang paling umum dan ditandai dengan kelainan kerja insulin dan proses sekresi insulin [19]. Secara patofisiologi, DM tipe 2 disebabkan karena respon jaringan

perifer terhadap insulin mengalami penurunan (resistensi insulin) dan kemampuan sel β pankreas dalam mensekresi insulin sebagai respon terhadap glukosa mengalami penurunan [18].

Komplikasi yang ditimbulkan akibat diabetes melitus bersifat kronis, terutama pada struktur dan fungsi pembuluh darah [20]. Apabila komplikasi diabetes melitus diabaikan, maka komplikasi lain yang cukup fatal akan muncul. Komplikasi tersebut antara lain penyakit jantung, ginjal, kebutaan, dan amputasi bagian-bagian tubuh [21].

2.2 Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.)

Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) adalah tanaman tahunan tropis dengan karakteristik antara lain batang berbentuk *quadrangular* (segi empat) yang berbulu dengan pertumbuhan batang mencapai 6,5 cm untuk pletekan dewasa, daunnya berbentuk *elips* sederhana yang berlawanan dengan panjang sekitar 5 cm, bunganya termasuk biseksual dengan warna ungu, serta kapsul yang berisi 7-8 biji [22].

Taksonomi dari tanaman pletekan adalah sebagai berikut [23]:

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Bangsa	: Scrophulariales
Suku	: Acanthaceae
Marga	: Ruellia
Jenis	: <i>Ruellia tuberosa</i> L.



Gambar 2.2 Tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) [23].

Senyawa metabolit sekunder dari tanaman pletekan antara lain flavonoid, lignan, alkaloid, kumarin, triterpen, sterol, fenolik glikosida, fenil etanoat, *megastigmane* glikosida, dan benzoxazinoid glikosida [24]. Daya L. Chotani (2012) dalam penelitiannya melaporkan bahwa kandungan senyawa bioaktif dari tanaman pletekan meliputi n-alkana, triterpenoid, fitosterol (stigmasterol, β -sitosterol, dan kampesterol), serta lupeol [25]. Khurram dkk menambahkan, dalam tanaman pletekan juga terdapat kandungan fitokimia yang meliputi alkaloid, saponin, dan flavonoid [26].

Pemanfaatan tanaman pletekan dalam berbagai penyakit secara tradisional telah banyak dilakukan oleh masyarakat. Beberapa manfaat dari tanaman pletekan antara lain untuk pengobatan penyakit telinga, kencing nanah, kanker perut, bronkitis, diuretik, anti-piretik, anti-diabetes, anti-hipertensi, analgesik, pereda batuk, dan gangguan ginjal [23].

2.3 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah jenis hewan yang paling banyak digunakan dalam hal penelitian. Hal tersebut dikarenakan tikus putih mempunyai karakteristik fungsional sistem model mamalia. Tikus putih berfungsi sebagai organisme model untuk beberapa analisis penting biomedis, seperti penyakit kardiovaskular, gangguan metabolisme (lipid, diabetes melitus), gangguan neurologikal (epilepsi, parkinson), transplantasi organ, gangguan autoimun, kanker serta gangguan ginjal [27].

Tikus putih galur Wistar mempunyai karakteristik, antara lain kepala yang lebar, telinga panjang, ekor panjang, memiliki massa tubuh sebesar 250-300 gram untuk tikus betina dewasa, sedangkan tikus jantan dewasa memiliki massa tubuh sebesar 450-520 gram, dan rentang usia 2,5-3,5 tahun [28]. Taksonomi dari tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut [29]:

Kerajaan	: Animal
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Order	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>norvegicus</i>



Gambar 2.3 *Rattus norvegicus* galur Wistar.

2.4 Kadar Glukosa Darah

Glukosa darah yang terdapat di dalam tubuh berperan dalam proses metabolisme dan sebagai sumber energi utama untuk otak. Glukosa darah terbentuk dari karbohidrat dalam makanan yang membentuk gula dan akan disimpan dalam bentuk glikogen di hati dan otot rangka [30]. Penyakit diabetes melitus dapat diketahui melalui parameter glukosa darah. Pada awalnya pemeriksaan penderita diabetes melitus dilakukan terhadap darah lengkap. Hal tersebut dikarenakan kadar protein yaitu hemoglobin yang tinggi pada eritrosit. Kadar glukosa darah dapat diukur menggunakan darah lengkap, misalnya serum atau plasma. Penggunaan serum lebih banyak digunakan karena di dalam serum banyak terdapat glukosa daripada darah lengkap. Glukosa akan diserap oleh usus halus dan akan didistribusikan oleh aliran darah ke seluruh sel tubuh [31]. Kadar glukosa darah normal berada pada rentang 50-135 mg/dl, dimana kadar glukosa yang melebihi 135 mg/dl disebut dengan hiperglikemia dan untuk kadar glukosa yang kurang dari 50 mg/dl disebut dengan hipoglikemia [32].

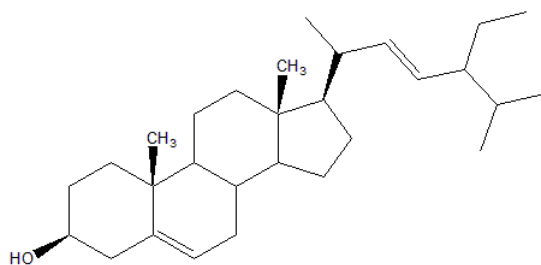
Kondisi Hiperglikemia menyebabkan banyaknya radikal bebas yang akan diproduksi. Radikal bebas dihasilkan akibat terganggunya kerja insulin akibat stres oksidatif, sehingga insulin tidak dapat menurunkan kadar glukosa darah secara maksimal [33]. Kerja insulin terganggu akibat sel β pankreas mengalami kerusakan yang disebabkan terganggunya permeabilitas membran sel oleh radikal bebas. Insulin berperan dalam masuknya glukosa ke dalam sel untuk di metabolisme. Namun, karena sel β pankreas rusak maka

glukosa tidak dapat di metabolisme sehingga akan menumpuk di dalam darah dan menyebabkan kadar glukosa darah meningkat [34]. Tingginya kadar glukosa darah pada penderita diabetes disebabkan aktivitas enzim mengalami peningkatan dalam jalur glukoneogenesis sehingga mempercepat jalur glikogenolitik dan lipolitik [35]. Selain itu, senyawa radikal bebas yang banyak terbentuk akan meningkatkan kondisi stres oksidatif yang berdampak pada kerusakan senyawa-senyawa makromolekul lainnya, seperti lipid dan protein. Senyawa makromolekul yang rusak mengakibatkan fungsi kerja organ mengalami penurunan, sehingga dapat menimbulkan penyakit lainnya seperti gagal ginjal, kebutaan, dan aterosklerosis [9].

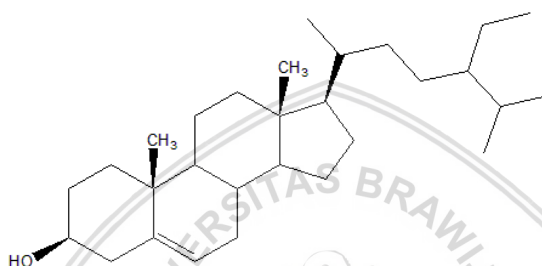
2.5 Senyawa Fitosterol Sebagai Antioksidan Alami

Fitosterol (sterol tumbuhan) merupakan salah satu jenis senyawa bioaktif dalam tumbuhan. Jenis utama dari sterol tumbuhan antara lain β -sitosterol (24- α -etilkolesterol), kampesterol (24- α -metilkolesterol), dan stigmasterol (Δ^{22} , 24- α -etilkolesterol). Jenis-jenis sterol tersebut terbukti efektif dan tidak terdapat efek yang merugikan ketika ditambahkan ke bahan makanan. Berdasarkan penelitian sebelumnya, senyawa fitosterol digunakan sebagai agen penurun kolesterol darah [36].

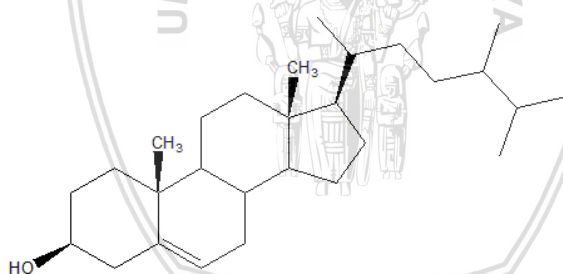
Stigmasterol merupakan jenis sterol tumbuhan tidak jenuh dalam lemak nabati. Senyawa stigmasterol berpotensi sebagai antioksidan serta mempunyai sifat menghambat hipoglikemia dan tiroid. β -sitosterol merupakan jenis sterol tumbuhan yang mempunyai struktur kimia yang hampir sama dengan kolesterol. Senyawa β -sitosterol mempunyai karakteristik antara lain berwarna putih, berbau yang khas, bersifat hidrofobik, dan larut dalam etanol dan kloroform serta tidak larut dalam air. β -sitosterol bersifat sebagai anti-kolesterol, anti-inflamasi, dan memberikan efek imunomodulator [13]. Selain itu, senyawa β -sitosterol dan stigmasterol bermanfaat dalam merangsang sekresi insulin dari pankreas [14]. Sedangkan kampesterol mempunyai struktur yang hampir sama dengan kolesterol, sehingga bermanfaat dalam menurunkan kolesterol. Kampesterol juga dapat dimanfaatkan sebagai senyawa anti-karsinogenik. Fungsi lain dari senyawa fitosterol antara lain, sebagai anti-inflamasi, anti-bakteria, dan mempunyai aktivitas anti-jamur [37].



Gambar 2.5.1 Struktur Kimia Stigmasterol



Gambar 2.5.2 Struktur kimia β -sitosterol



Gambar 2.5.3 Struktur kimia Campesterol

Sedangkan antioksidan adalah zat yang dapat menghambat oksidasi molekul-molekul penting (protein, lemak, DNA) yang diakibatkan adanya radikal bebas [34]. Mekanisme kerja dari antioksidan dalam menghambat oksidasi molekul-molekul adalah dengan cara melengkapi kekurangan elektron dari senyawa radikal bebas, sehingga senyawa radikal bebas akan stabil dan menghambat reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas. Berdasarkan sumbernya, antioksidan terdapat 2 kelompok, yaitu antioksidan endogen (dari dalam tubuh) dan antioksidan eksogen (dari luar tubuh).

SOD (superoksida dimutase), katalase, dan glutathion peroksidase adalah contoh dari antioksidan endogen. Sedangkan antioksidan eksogen meliputi vitamin-vitamin dan senyawa metabolite sekunder dari tanaman [8].

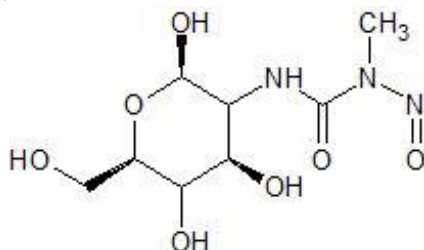
2.6 Streptozotocin

Streptozotocin (STZ) merupakan obat penginduksi diabetes permanen. Streptozotocin adalah aminoglikosida yang mengandung kelompok nitrosoamino yang ditemukan pada tahun 1959 sebagai antibiotik. Kelompok nitrosoamino dapat bertindak sebagai donor nitrat oksida (NO) [38]. Sifat fisika dan kimia dari STZ antara lain, memiliki berat molekul sebesar 265 g/mol, rumus molekul $C_8H_{15}N_3O_7$, larut dengan baik dalam akuades, keton dan alkohol dengan persentase yang rendah, tidak dapat larut dengan baik dalam pelarut organik polar, serta kestabilan maksimum larutan STZ adalah pada pH 4. Kestabilan menurun dengan cepat pada pH yang terlalu tinggi atau rendah. STZ dapat disimpan selama kurang lebih 2 tahun pada suhu $-20^{\circ}C$, hal tersebut karena STZ stabil pada suhu tersebut [39,40].

Cara kerja dari STZ adalah dengan membentuk radikal bebas sangat reaktif yang dapat menimbulkan kerusakan pada membran sel, protein, dan DNA. Kerusakan-kerusakan tersebut menyebabkan gangguan produksi insulin oleh sel β Langerhans pankreas. STZ akan memasuki sel β Langerhans pankreas melalui *glucose transporter 2* (GLUT 2) yang akan menyebabkan terjadinya alkilasi. Sebelumnya terjadi pembatasan pembentukan adenosin trifosfat pada mitokondria akibat pembentukan radikal bebas, enzim *xanthine* oksidase meningkat dan siklus Krebs terhambat [41]. Siklus Krebs terhambat akibat spesies oksigen reaktif (ROS) yang meliputi radikal superoksida ($O_2^{\cdot-}$), radikal hidroksil (OH), dan hidrogen peroksida (H_2O_2) mengalami peningkatan. NO yang dihasilkan dari STZ akan bereaksi dengan radikal superoksida ($O_2^{\cdot-}$) menghasilkan reaksi yang sangat toksik terhadap sel β pankreas karena menyebabkan DNA pankreas mengalami kerusakan. Di dalam mitokondria, pemakaian oksigen mengalami penurunan yang menyebabkan jumlah ATP mitokondria yang diproduksi menjadi terbatas. Produksi ATP yang terbatas dalam mitokondria dapat meningkatkan substrat yang digunakan enzim *xanthin* oksidase untuk mengkatalisis pembentukan

anion (O_2^-) aktif. Produksi radikal superoksida yang terus meningkat akan diikuti dengan peningkatan radikal hidroksil dan hidrogen peroksida yang menyebabkan pankreas mengalami kerusakan, sehingga sintesis dan sekresi insulin akan terhambat [42]. Induksi STZ dapat menimbulkan kerusakan tergantung dosis dan jenis perlakuan terhadap hewan uji. Senyawa radikal bebas dilepas akibat sitotoksitas STZ yang dapat memicu stres oksidatif intraseluler. Induksi STZ menyebabkan kerusakan sel β Langerhans pankreas yang terjadi dalam waktu 2-4 hari setelah induksi STZ. Kerusakan ditandai dengan pembengkakan pankreas dan sel β Langerhans pankreas mengalami degenerasi [43].

Lenzen (2008) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa hasil induksi STZ lebih baik daripada induksi alloxan untuk menyebabkan hewan uji terpapar diabetes [44]. Hal tersebut dikarenakan STZ mempunyai batas keamanan yang lebih baik daripada alloxan, dimana rentang dosis dari STZ lebih lebar dan jarang mengalami keadaan ketosis daripada alloxan. Selain itu induksi STZ lebih baik digunakan dalam penelitian untuk membuat hewan uji terpapar diabetes dikarenakan STZ mampu mempertahankan hiperglikemia dalam waktu yang cukup lama, sehingga pengamatan terhadap komplikasi diabetes dan patofisiologi hewan uji lebih mudah dilakukan pengamatan [41]. Hewan uji dapat terpapar DM tipe 1 atau DM tipe 2 sesuai dengan dosis STZ yang diinduksikan [45]. Tetapi pemberian dosis STZ yang terlalu tinggi dapat menyebabkan kematian hewan uji pada minggu pertama setelah induksi STZ. Hal tersebut dikarenakan terjadinya kerusakan yang menyeluruh pada sel β pankreas, sehingga kadar glukosa darah mengalami peningkatan yang tidak terkendali [46]. Selain merusak sel β pankreas, STZ juga dapat menyebabkan kerusakan pada ginjal, reaksi alergi, dan kerusakan sel darah putih [38].



Gambar 2.6 Struktur Kimia Streptozotocin.

2.7 Karakterisasi LC-MS

LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) merupakan teknik analisis kombinasi dari instrumen HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dan MS (*Mass Spectrometry*). Mekanisme kerja dari LC-MS adalah suatu sampel akan dipisahkan oleh LC (*Liquid Chromatography*) dan spesies sampel yang terpisah akan disemprotkan ke sumber tekanan ion, yang mana sampel-sampel tersebut akan dikonversi menjadi ion dalam fase gas. Penganalisis massa berfungsi dalam menyortir ion berdasarkan massa-nya. Kemudian, detektor menghitung ion yang muncul dari penganalisis massa serta memperkuat sinyal yang telah disortir dari setiap ion. Selanjutnya akan dihasilkan spektrum massa yang digunakan dalam penentuan massa partikel suatu molekul dan untuk mengetahui struktur kimia dari suatu molekul [47].

Fragmentasi ion utama (m/z) senyawa fitosterol jenis kampesterol adalah 383 $[M-H_2O+H]^+$ dengan berat molekul sebesar 400 g/mol. Pada stigmasterol mempunyai fragmentasi ion (m/z) sebesar 395 $[M-H_2O+H]^+$ dengan berat molekul sebesar 412 g/mol. Sedangkan pada β -sitosterol, nilai fragmentasi ion-nya sebesar 397 $[M-H_2O+H]^+$ dengan berat molekul sebesar 414 g/mol [48].

2.8 Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini yaitu:

1. Ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) mengandung senyawa metabolit sekunder yang dapat berfungsi sebagai antioksidan.
2. Ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) mampu menurunkan kadar glukosa darah pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang terpapar MLD-STZ.
3. Dosis terapi ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) yang diberikan memberikan pengaruh yang berbeda-beda terhadap kadar glukosa darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang terpapar MLD-STZ.



BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), dan Institut Biosains Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Februari sampai bulan Juni 2018.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat gelas (cawan petri, labu takar 10 mL dan 100 mL, pipet tetes, gelas ukur 10 mL, batang pengaduk, gelas arloji, gelas kimia 50 mL dan 100 mL, corong gelas, erlenmeyer 250 mL, pipet ukur), bola hisap, *rotary evaporator*, bejana kaca, seperangkat bak pemeliharaan hewan uji, botol semprot, lemari pendingin, neraca analitik, *blood lancet*, *blood strip*, spuit, jarum sonde, aluminium foil, masker, tisu, sarung tangan, oven, cawan gelas, tanur, instrumen LC-MS (*Liquid Chromatigraphy-Mass Spectrometry*) : UHPLC ACCELLA tipe 1250 merk *Thermo Scientific* dengan spektrometri massa TSQ QUANTUM ACCESS MAX merk *Thermo Finnigan*, *glucometer digital* (NESCO *MultiCheck*), botol vial, pH meter, dan vortex.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) yang diperoleh dari Materia Medica, Batu, Malang, larutan etanol, akuades, sampel darah tikus (*Rattus norvegicus*), *streptozotocin* (STZ), alkohol 70%, asam sitrat 0,2 M, natrium sitrat 0,2 M.

3.3 Tahapan Penelitian

Tahap-tahap penelitian ini yaitu:

1. Pembuatan ekstrak etanol akar pletekan dan penentuan dosis terapi
2. Karakterisasi ekstrak etanol akar pletekan dengan instrumentasi LC-MS

3. Persiapan hewan uji
4. Pembuatan larutan dan injeksi STZ secara IP, serta inkubasi hewan uji
5. Pengukuran kadar glukosa darah dengan glukometer
6. Terapi hewan uji dengan ekstrak etanol akar pletekan oral dan pengecekan kadar glukosa darah
7. Analisa data

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Akar Pletekan dan Penentuan Dosis Terapi

Serbuk akar pletekan sebanyak 900 gram dengan ukuran 90 mesh dimaserasi dengan pelarut etanol-akuades (1:1) sebanyak 2,5 kali berat serbuk. Larutan maserasi didiamkan hingga 24 jam. Ekstrak cair yang diperoleh disaring menggunakan kertas saring hingga diperoleh filtrat. Ekstrak cair diuapkan dengan *rotary evaporator* pada temperatur 50°C, 120 rpm hingga diperoleh ekstrak kental etanol akar pletekan berwarna coklat kehitaman pekat. Proses maserasi diulang hingga 3 kali dengan pelarut etanol-akuades dari proses penguapan dengan *rotary evaporator*. Sedangkan untuk penentuan dosis terapi, ekstrak pekat etanol akar pletekan dilarutkan dalam akuades dan dimasukkan ke dalam lambung tikus secara oral sebanyak 3 mL sesuai dengan ukuran maksimal lambung tikus. Dosis terapi yang digunakan adalah 250 mg/kg BB, 375 mg/kg BB, dan 500 mg/kg BB.

3.4.2 Karakterisasi Ekstrak Etanol Akar Pletekan dengan Instrumentasi LC-MS

Karakterisasi ekstrak dilakukan dengan menggunakan instrumen LC-MS untuk mengetahui adanya senyawa metabolit sekunder spesifik pada ekstrak etanol akar pletekan. Karakterisasi dilakukan dengan menggunakan ekstrak kental etanol akar pletekan sebanyak ± 1 g. Instrument yang digunakan adalah LCMS, yaitu dengan kondisi LC adalah sebagai berikut: pelarut A H₂O, pelarut B 0,1% asam format dalam asetronitril, pelarut C 20 mMol amonium format, pelarut D 0,1% asam format dalam metanol, laju alir 250 μ l/min, volume injeksinya sebesar 2.000 μ l, volume pembilasan 400 μ l, panjang jarum 2.000 mm, kecepatan pembilasan 100.000 μ l, temperatur kolom 40°C dengan UHPLC yang digunakan adalah

ACCELLA tipe 1250 merk *Thermo Scientific*. Kemudian spektrometer massa menggunakan TSQ QUANTUM ACCESS MAX merk *Thermo Finnigan* dengan sumber ionisasi menggunakan ESI (ionisasi elektropray) dalam mode positif.

3.4.3 Persiapan Hewan Uji

Hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan berusia ± 2 bulan yang diperoleh dari Institut Biosains, Universitas Brawijaya Malang. Tikus putih berjumlah 20 ekor dengan berat badan ± 200 gram. Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok perlakuan, yaitu kelompok I tikus normal, kelompok II tikus (+) DM, kelompok III tikus (+) DM dengan dosis terapi 250 mg/kg BB, kelompok IV (+) DM dengan dosis terapi 375 mg/kg BB, dan kelompok V (+) DM dengan dosis terapi 500 mg/kg BB. Tiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus, hewan uji diaklimatisasi selama 1 minggu di Laboratorium Hewan Biosains.

3.4.4 Pembuatan Larutan dan Injeksi (STZ) secara IP serta Inkubasi Hewan Uji

325,9 mg serbuk STZ ditimbang menggunakan neraca analitik, kemudian dilarutkan dalam 4,870 mL buffer sitrat 0,1 M pH 4,5 dan di *vortex* hingga homogen. Larutan stok digunakan untuk injeksi dan disimpan pada temperatur 4°C.

Volume yang digunakan untuk injeksi ke tikus disesuaikan dengan berat badan tikus. Dosis yang digunakan sebesar 20 mg/KgBB yang akan diinjeksikan secara IP selama 5 hari berturut-turut. Posisi tikus diarahkan ke arah frontal (atas) agar abdomennya terlihat. Bagian atas abdomen tikus diusap dengan alkohol 70%, kemudian kulitnya dicubit lalu jarum suntik dimasukkan dan digerakkan, jika terasa berat maka jarum suntik telah masuk pada area IP. STZ dimasukkan secara perlahan dan abdomen tikus diusap kembali dengan alkohol 70%. Tikus yang telah diinduksi STZ diinkubasi selama 4 hari. Pengecekan kadar glukosa darah dilakukan setiap 7 hari sekali untuk mengetahui kadar glukosa darah. Tikus dengan kadar glukosa darah lebih dari 200 mg/dL dikatakan positif diabetes melitus.

3.4.5 Pengukuran Kadar Glukosa Darah dengan Glukometer

Pengukuran kadar glukosa darah tikus dilakukan pada kelima kelompok perlakuan. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan pada setelah aklimatisasi (sebelum injeksi STZ), inkubasi setelah injeksi STZ, dan setiap 7 hari sekali selama 3 minggu proses terapi DM. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan mula-mula ujung ekor tikus diusapkan alkohol 70%, kemudian ditusuk dengan *blood lancet* agar darahnya keluar. Kemudian darah tikus yang keluar dimasukkan kedalam ujung *blood strip* yang telah terhubung dengan glukometer dan dibaca kadar glukosa darah tikus.

3.4.5.2 Terapi Hewan Uji dengan Ekstrak Etanol Akar Pletekan secara Oral

Terapi hewan coba dilakukan dengan menggunakan ekstrak etanol akar pletekan pada tikus kelompok (+) DM terapi, dimana dosis yang digunakan adalah sebesar 250 mg/kg BB, 375 mg/kg BB, dan 500 mg/kg BB. Ekstrak pekat etanol akar pletekan dilarutkan dalam akuades, banyaknya (mg) ekstrak yang diambil didasarkan pada berat badan masing-masing tikus. Terapi dilakukan selama 21 hari sebanyak 1 x 3 mL secara oral. Pengecekan kadar glukosa darah dengan glukometer dilakukan setiap 7 hari sekali dengan glukometer.

3.4.6 Analisa Data

Data kadar glukosa darah yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji *One-Way ANOVA* (*Analysis of Variance*) dan uji lanjutan BNJ dengan $\alpha = 0,05$.

BAB IV PEMBAHASAN

4.1 Hasil Ekstraksi Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.)

Ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) diperoleh dari ekstraksi serbuk akar pletekan sebanyak 900 gram berukuran 90 mesh dengan pelarut etanol:akuades (1:1) melalui proses maserasi selama 3x24 jam. Proses maserasi menggunakan pelarut etanol-akuades bertujuan untuk mengisolasi zat aktif dari akar pletekan yang bersifat polar maupun non-polar. Pada proses maserasi digunakan etanol:akuades (1:1) sebanyak 2,5 kali berat serbuk bertujuan untuk merendam serbuk akar pletekan secara maksimal, sehingga dapat diperoleh hasil ekstrak etanol akar pletekan yang maksimal. Proses maserasi dilakukan selama 24 jam agar dinding dan membran sel serbuk akar pletekan pecah, sehingga senyawa metabolit sekunder yang terdapat di dalam akar pletekan dapat terlarut dalam pelarut yang digunakan [49].

Maserat serbuk akar pletekan yang diperoleh dari 900 gram akar pletekan adalah 255,96 gram. Rendemen dari ekstrak yang diperoleh dapat dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{massa ekstrak yang diperoleh}}{\text{massa simplisia yang diekstraksi}} \times 100\%$$

$$\% \text{ rendemen} = \frac{255,96}{900} \times 100\%$$

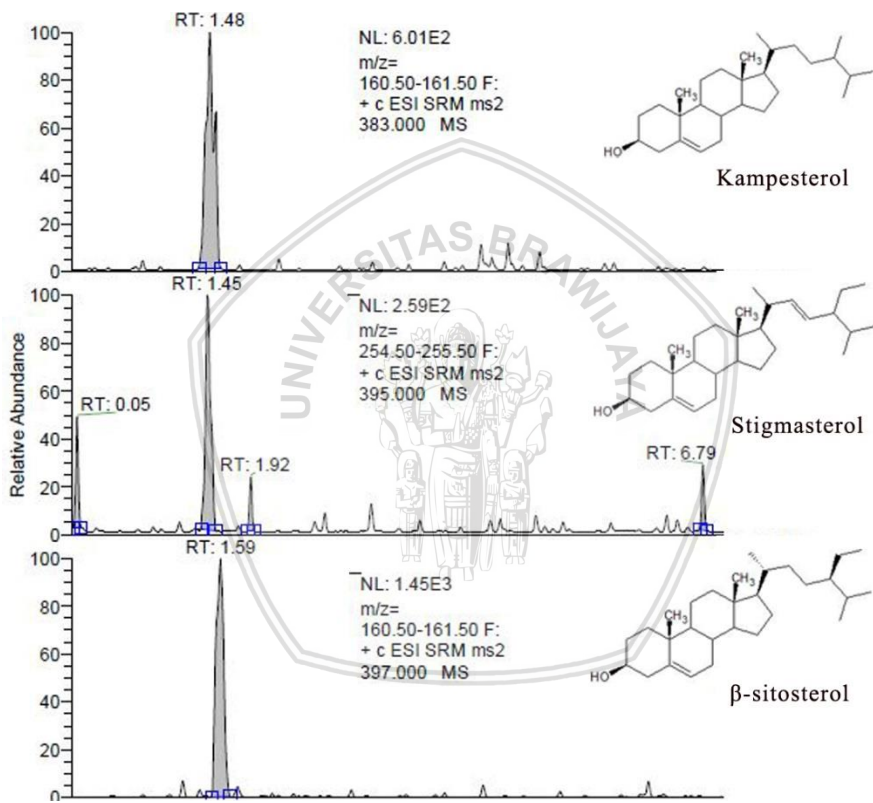
$$\% \text{ rendemen} = 28,44\%$$

Ekstrak etanol akar pletekan yang diperoleh mempunyai karakteristik spesifik antara lain, berwarna coklat kehitaman, berbentuk ekstrak kental pekat, dan tidak berbau. Sedangkan untuk karakteristik tidak spesifik antara lain, mempunyai kadar abu sebesar 10,543% dan kadar air sebesar 10%.

4.2 Karakterisasi Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) Menggunakan LC-MS

Karakterisasi ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) dilakukan dengan menggunakan LC-MS bertujuan untuk

mengetahui senyawa metabolit sekunder spesifik yang terkandung dalam ekstrak etanol akar pletekan. Berdasarkan hasil uji kualitatif fitokimia, diketahui bahwa ekstrak etanol akar pletekan mengandung senyawa metabolit sekunder jenis steroid (**Lampiran E**). Sehingga, karakterisasi ekstrak etanol akar pletekan menggunakan LC-MS dititikberatkan untuk senyawa steroid. Kromatogram dan data hasil karakterisasi LC-MS ditunjukkan pada **Gambar 4.1 dan Tabel 4.1**.

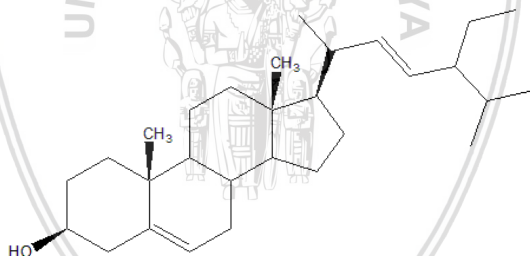


Gambar 4.1 Kromatogram prediksi senyawa kampesterol, stigmasterol, dan β-sitosterol.

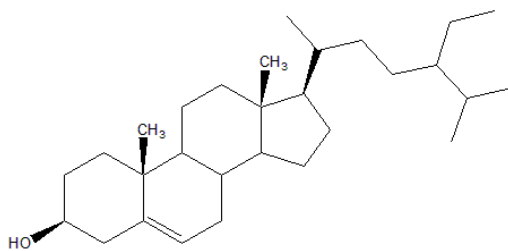
Tabel 4.1. Interpretasi hasil LC-MS untuk senyawa fitosterol

Waktu Retensi (detik)	Fragmentasi Ion	$[M]^+$ (m/z)	Prediksi senyawa fitosterol
1,45	254,50-255,50	395	Stigmasterol
1,59	160,50-161,50	397	β -sitosterol
1,48	160,50-161,50	383	Kampesterol

Berdasarkan **Tabel 4.1**, puncak kromatogram pada waktu retensi 1,45 menunjukkan fragmen $[M-H_2O+H]^+$ sebesar 395 m/z . Senyawa fitosterol yang diprediksi mempunyai rasio massa terhadap muatan sebesar 395 m/z adalah stigmasterol. Berdasarkan penelitian Panawan dkk (2015) [48], diketahui fitosterol jenis stigmasterol mempunyai m/z sebesar 395 dengan berat molekul sebesar 412. Hal tersebut sesuai dengan hasil analisis yang diperoleh. Sehingga, dalam ekstrak etanol akar pletekan terdapat kandungan senyawa fitosterol jenis stigmasterol ($C_{29}H_{48}O$). Struktur kimia dari senyawa stigmasterol ditunjukkan pada **Gambar 4.2**.

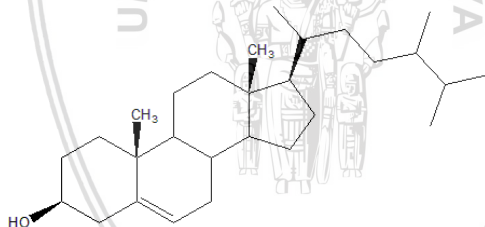
**Gambar 4.2** Struktur kimia Stigmasterol.

Selanjutnya, puncak kromatogram pada waktu retensi 1,59 menunjukkan fragmen $[M-H_2O+H]^+$ pada 397 m/z . Senyawa fitosterol yang diprediksi mempunyai rasio massa terhadap muatan sebesar 397 m/z adalah β -sitosterol. Fitosterol jenis β -sitosterol mempunyai m/z sebesar 397 dengan berat molekul sebesar 414 [48]. Hal tersebut sesuai dengan hasil analisis yang diperoleh. Sehingga, dalam ekstrak etanol akar pletekan juga terdapat kandungan fitosterol jenis β -sitosterol ($C_{29}H_{50}O$). Struktur kimia dari senyawa β -sitosterol ditunjukkan pada **Gambar 4.2**.



Gambar 4.3 Struktur kimia β -sitosterol

Sedangkan puncak kromatogram pada waktu retensi 1,48 menunjukkan fragmen $[M-H_2O+H]^+$ sebesar 383 m/z . Senyawa fitosterol yang diprediksi mempunyai rasio massa terhadap muatan sebesar 383 m/z adalah kampesterol. Senyawa kampesterol mempunyai m/z sebesar 383 dengan berat molekul sebesar 400 [48]. Hal tersebut sesuai dengan hasil analisis yang diperoleh. Sehingga, dalam ekstrak etanol akar pletekan terdapat kandungan fitosterol jenis kampesterol ($C_{28}H_{48}O$). Struktur kimia dari senyawa kampesterol ditunjukkan pada **Gambar 4.3**.



Gambar 4.4 Struktur kimia kampesterol.

4.3. Pengaruh Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 1 Akibat Induksi MLD-STZ

STZ merupakan senyawa kimia yang dapat menyebabkan sel-sel β pada kelenjar pankreas mengalami kerusakan. Injeksi MLD-STZ secara IP dilakukan selama 5 hari berturut-turut dengan dosis sebesar 20 mg/kg BB. Injeksi STZ terhadap tikus putih menyebabkan tikus putih menderita diabetes melitus akibat kerusakan sel β pankreas. Tikus putih yang menderita diabetes melitus ditandai dengan tingginya kadar glukosa darah.

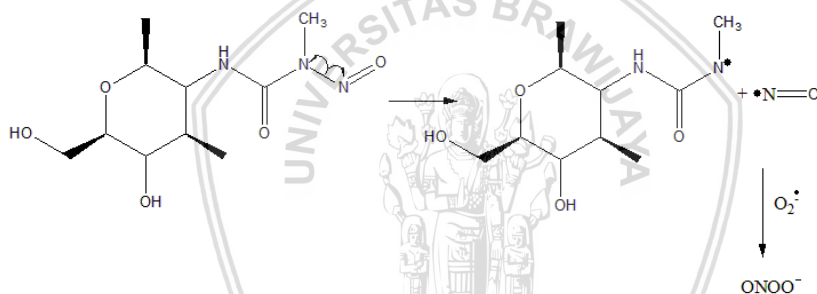
Tabel 4.2 Kadar glukosa darah tikus kontrol negatif DM, kelompok positif DM, kelompok terapi 250 mg/kg BB, 375 mg/kg BB, dan 500 mg/kg BB.

Kelompok perlakuan	Rata-rata Kadar Glukosa Darah (mg/dL)	Kadar Glukosa Darah (%)	
		Peningkatan	Penurunan
Kontrol Negatif	134,25 ± 20,77 ^a	-	-
Kelompok Positif	542 ± 18,02 ^e	303,72	-
Terapi 250 mg/kg BB	246,25 ± 25,38 ^b	-	54,56
Terapi 375 mg/kg BB	337,50 ± 14,20 ^c	-	37,70
Terapi 500 mg/kg BB	451 ± 13,88 ^d	-	16,79

Keterangan: Perbedaan notasi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok dengan nilai $p < 0,05$

Pada hasil penelitian ini, hasil pengukuran kadar glukosa darah dapat dilihat pada **Tabel 4.2**. Pada **Tabel 4.2** terlihat bahwa kadar rata-rata glukosa darah tikus kelompok kontrol negatif DM sebesar 134,25 ± 20,77 mg/dL (kadar glukosa darah normal 50 – 135 mg/dL) [50]. Sedangkan kadar rata-rata glukosa tikus kelompok kontrol positif DM sebesar 542 ± 18,02 mg/dL (meningkat 303,72% dibanding kelompok kontrol negatif). Hal tersebut sesuai dengan beberapa hasil penelitian bahwa tikus yang dinyatakan menderita DM apabila kadar glukosa darahnya >200 mg/dL [51]. Pada kelompok terapi (250 mg/kg BB, 375 mg/kg BB, dan 500 mg/kg BB) kadar glukosa darah mengalami penurunan dibandingkan kelompok kontrol positif. Namun, data pada **Tabel 4.2** menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis terapi menyebabkan persen penurunan kadar glukosa darah yang semakin rendah. Berdasarkan hasil analisa data secara statistik juga menunjukkan bahwa peningkatan dosis terapi berpengaruh signifikan terhadap penurunan kadar glukosa, namun tidak didapatkan dosis optimum terapi pada penelitian ini. Hasil analisa secara statistik menunjukkan bahwa data kadar glukosa darah

antar kelompok perlakuan termasuk homogen dan terdistribusi secara normal ($p > 0,05$). Hasil uji *One-Way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Sedangkan pada hasil uji statistik *Tukey test*, pemberian notasi menunjukkan adanya perbedaan kadar glukosa yang nyata antara kelompok kontrol negatif DM, kelompok positif DM, kelompok terapi 250 mg/kg BB, kelompok terapi 375 mg/kg BB, dan kelompok terapi 500 mg/kg BB. Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai notasi yang berbeda pada tiap kelompok perlakuan. Perbedaan yang nyata antara kelompok positif dengan kelompok terapi 250 mg/kg BB, 375 mg/kg BB, dan 500 mg/kg BB menunjukkan pemberian ekstrak etanol akar pletekan berpengaruh terhadap penurunan kadar glukosa darah tikus yang terpapar diabetes melitus.

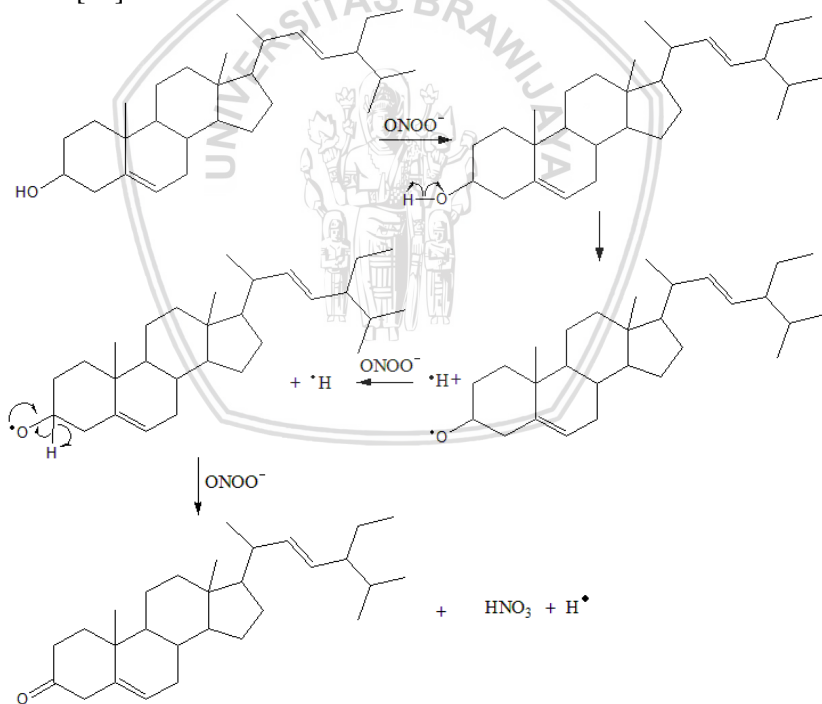


Gambar 4.5 Mekanisme pembentukan ion peroksinitrit (ONOO^-)

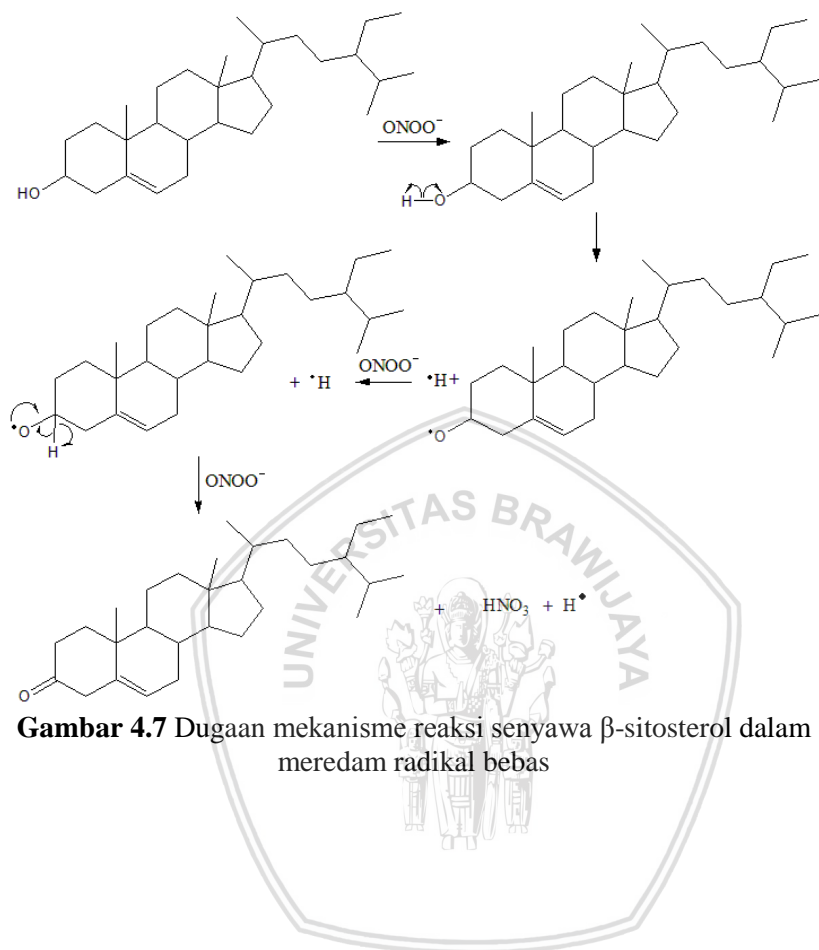
Mekanisme reaksi radikal bebas dapat terjadi melalui tiga tahapan, yaitu inisiasi, propagasi, dan terminasi [52]. Pada tahap inisiasi terjadi pembentukan awal radikal bebas. STZ akan menghasilkan radikal bebas $\text{NO}(\bullet\text{NO})$ melalui pembelahan homolitik, kemudian berikatan dengan radikal superoksida ($\text{O}_2\bullet$) dan menghasilkan ion peroksinitrit (ONOO^-) (**Gambar 4.5**). Selanjutnya melalui tahapan propagasi, yaitu pemanjangan rantai radikal bebas karena radikal bebas yang dihasilkan dari tahapan inisiasi akan bereaksi dengan molekul lain. Gugus $-\text{OH}$ (hidroksil) pada senyawa fitosterol akan mengalami pemutusan homolitik dan akan menghasilkan atom $\text{H}\bullet$ (H radikal) dan $\text{O}\bullet$ (O radikal). Tahap yang terakhir adalah terminasi, pada tahapan ini senyawa radikal bebas akan

bereaksi dengan senyawa radikal bebas yang lain. Sehingga tidak membentuk senyawa radikal bebas yang baru. Ion peroksinitrit (ONOO^-) akan bereaksi dengan H^\bullet yang akan menghasilkan HNO_3 . Sedangkan O^\bullet akan menjadi O ikatan rangkap melalui pemutusan intramolekuler. Dugaan mekanisme reaksi senyawa fitosterol yang terkandung dalam ekstrak etanol akar pletekan dapat dilihat pada **Gambar 4.6, 4.7, dan 4.8.**

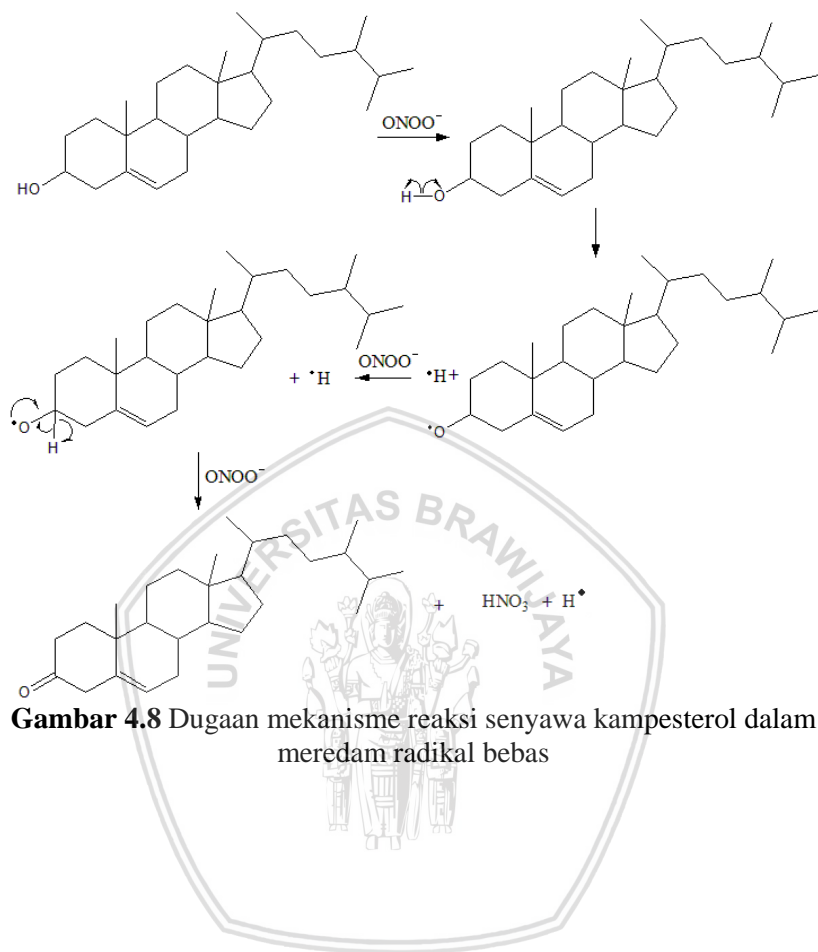
Senyawa fitosterol yang meliputi stigmasterol, β -sitosterol, dan kampesterol bekerja secara sinergis dalam meredam radikal bebas, sehingga memberikan dampak yang cukup besar dalam penurunan kadar glukosa darah. Selain itu, senyawa β -sitosterol dan stigmasterol bermanfaat dalam merangsang sekresi insulin dari pankreas yang dapat menyebabkan proses metabolisme glukosa oleh insulin dapat berjalan. Sehingga, terjadi penurunan kadar glukosa darah [14].



Gambar 4.6 Dugaan mekanisme reaksi senyawa stigmasterol dalam meredam radikal bebas



Gambar 4.7 Dugaan mekanisme reaksi senyawa β -sitosterol dalam meredam radikal bebas



Gambar 4.8 Dugaan mekanisme reaksi senyawa kampesterol dalam meredam radikal bebas



BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan:

1. Berdasarkan hasil karakterisasi menggunakan LC-MS, ekstrak etanol akar pletekan mengandung metabolit sekunder jenis fitosterol yang meliputi β -sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol.
2. Terapi ekstrak etanol akar pletekan mampu menurunkan kadar glukosa darah tikus yang terpapar diabetes melitus (DM).
3. Terapi ekstrak etanol akar pletekan dengan dosis 250 mg/kg BB memberikan penurunan kadar glukosa darah paling tinggi yaitu sebesar 54,56%. Sedangkan penurunan kadar glukosa darah pada dosis 375 mg/kg BB sebesar 37,70% dan untuk dosis 500 mg/kg BB sebesar 16,79%.

5.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis optimum ekstrak etanol akar pletekan sebagai terapi penyakit diabetes melitus (DM) dengan dosis terapi lebih rendah dari 250 mg/kg BB serta diperlukan karakterisasi LC-MS kandungan fitosterol dalam ekstrak etanol akar pletekan secara kuantitatif.



DAFTAR PUSTAKA

- [1] World Health Organization. (n.d.). (2013). WHO | Diabetes. Retrieved July 7, 2018, from <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- [2] International Diabetes Federation. What is Diabetes. Retrieved July 6, 2018, from <https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/facts-figures.html>
- [3] Eveninda, V., Winarto, dan Wiwik R. (2013). Efek Kombinasi Glibenklamid dan Minyak Buah Merah (*Pandanus conoidens* L.) terhadap Indeks Aterogenik Plasma Tikus Jantan Galur Wistar yang diinduksi Streptozotocin. Fakultas Kedokteran Universitas Riau, Riau.
- [4] Santoso dan Zaini. (2002). *Prospek Tantangan Patofisiologi Konsep Klinis Proses-proses Penyakit Edisi 6*. Jakarta: EGC.
- [5] Dewi, Devis R., Aulanni'am, Anna Roosdiana. (2013). Studi Pemberian Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum prismaticum*) terhadap Kadar MDA dan Histopatologi Jaringan Pankreas pada Tikus *Rattus norvegicus* Diabetes Melitus Tipe 1 Hasil Induksi MLD-STZ (*Multiple Low Dose-Streptozotocin*). *Kimia Student Journal*. 2(1). 351-357.
- [6] Abou-Seif M.A., and A.A. Youssef. (2004). Evaluation of Some Biochemical Changes in Diabetic Patiens. *Clinica Chimica Acta*. (346). 161-170.
- [7] Kaneto, H., Y. Kajimoto, J. Miyagawa, T. Matsuoka, Y. Fujitani, Y. Umayahara, T. Hanafusa, Y. Matsuzawa, Y. Yamasaki, and M. Hori. (1999). Beneficial Effects of Antioxidants in Diabetes: Possible Protection of Pancreatic β -Cells Againsts Glucose toxicity. *Journal of Diabetes*. 48. 2398-2406.

- [8] Maritim A.C., Sanders R.A., Wtkins J.B. (2003). Diabetes, Oxidative Stres, and Antioxidant: a Review. *Journal of Biochemistry Molecular Toxicology*. 17. 24-38.
- [9] Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., and Rodwell V.W. (2003). *Biokimia Harper Edisi 25, Diterjemahkan oleh Hartono*. Jakarta: EGC.
- [10] Wilson, G.L. and S.P. LeDoux. (1989). The Role of Chemical in the Etiology of Diabetes Melitus. *Toxicologic Pathology Journal*. 17(2). 357-362.
- [11] Wiyono P. (2003). Peranan Hiperglikemia terhadap Terjadinya Komplikasi Kronik Diabetes Melitus. *B.I. Ked*. 35(1). 55-60.
- [12] Nathan M.N, Buse J.B, Mayer B.D, Ferrannini E., Holman R.R., Sherwin R., and Zinman B. (2008). Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Alogarithm for Initiation and Adjustment of Therapy. *Diabetes Care*. 31(1). 173-175.
- [13] Purnomo, Yudi, Djoko Wahono Soetmadji, Sutiman Bambang Sumitro, and Mochamad Aris Widodo. (2015). Anti-diabetic Potential of *Urena lobata* Leaf Extract through Inhibition of Dipeptidyl Peptidase IV Activity. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine*. 1-5.
- [14] Rachmawani, Nadir Rahil, dan Rami Zakiah Oktarlina. (2017). Khasiat Pemberian Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) sebagai Terapi Alternatif Diabetes Melitus Tipe 2. *Jurnal Kedokteran*. Universitas lampung. 6(1). 71-76.
- [15] Amri, A.D.F. (2014). Uji Aktivitas Antidiabetes dari Ekstrak Etanol 70% Tanaman Pecah Beling Hutan (*Ruellia tuberosa* L.) Menggunakan Metode Penghambatan Enzim α -Glukosidase Secara in Vitro. (S.Farm Skripsi). Fakultas

Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta. Indonesia.

- [16] Lanywati, Endang. (2001). *Diabetes Melitus Penyakit Kencing Manis*. Yogyakarta: Kanisius.
- [17] Upoyo, Arif S., Muniroh, dan Maryana. (2015). Gambaran Elektrolit (Natrium-Kalium Serum) Penderita Diabetes Di RS Prof. Margono Soekarjo Purwokerto. *Jurnal Kesehatan: Samodra Ilmu*. 6(1).
- [18] Nugroho, A.E. (2006). Hewan Percobaan Diabetes Melitus: Patologi dan Mekanisme Aksi Diabetogenik. *Biodeversitas*. 7(4). 378-382.
- [19] WHO. (1999). Definiton, Diagnosis and Classification of Diabetes Melitus and its Complications. *World Health Organization Technical Report Series*. Geneva.
- [20] Sjaifoellah. (1996). *Ilmu Penyakit Dalam*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- [21] Anthony. (2004). Health Promotion and Health Education About Diabetes Melitus. *The Journal of the Royal Society for the Promotion of Health*. 124(2). 70-73.
- [22] Chaitanya, B. Khrisna., Atigari, Diana Vivian., Babu, S. Ravindra., Ravella, Alekhya, and Vardhan Jayasree. (2012). Hypolipidemic and Anti Oxidant Activity of *Ruellia tuberosa* Linn. *International Journal of Pharmacy a Biological Science*. (e-ISSN: 2230-7605).
- [23] Chothani, D.L., Patel M.B., Mishra S.H., and Vaghasiya H.U. (2010). Review on *Ruellia tuberosa* (Cracker Plant). *Pharmacognosy Journal*. 2(12). 506-512.
- [24] Samy, M.N., Sachiko S., Katsuyoshi M., Hideaki O., and Mohammed S.K. (2015). Chemical Constituents and

Biological Activities of Genus *Ruellia*. *International Journal of Pharmacognosy*. 2(6). 270-279.

- [25] Chothani, Daya L., S.H. Mishra. (2012). *In Vitro* Anti-oxidant Activity of *Ruellia tuberosa* Root Extracts. *Free Radicals and Antioxidant Journal*. 2(4).
- [26] Afzal, Khurram, Muhammad Uzair, Bashir Ahmad Chaudhary, Ashfaq Ahmad, Samina Afzal, and Malik Saadullah. (2015). Genus *Ruellia*: Pharmacological and Phytochemical Importance in Ethnopharmacology. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*. 72(5). 821-827.
- [27] Krinke, Georg J. (2000). *The Handbook of Experimental Animals: The Laboratory Rat*. Switzerland: Academic Press.
- [28] Alexandru, Iliuta. (2011). Experimental Use of Animals in Research Spa. *Balneo-Research Journal*. 2.
- [29] Sharp, Patrick and Jason Villano. (2012). *The Laboratory Rat Second Edition*. Boca Raton: CRC Press.
- [30] Joyce, L.K. (2006). *Buku Saku Pemeriksaan Laboratorium dan Diagnostik dengan Implikasi Keperawatan*. Jakarta: EGC.
- [31] Subiyono, M., Atik M., dan Denni G. (2016). Gambaran Kadar Glukosa Darah Metode GOD-PAP (*Glucose Oxidase-Peroxidase Aminoantypirin*) Sampel Serum dan Plasma EDTA (*Ethylen Diamin Teta Acetat*). *Jurnal Teknologi Laboratorium*. 5(1). 45-48.
- [32] De D, Chatterjee K., Ali K.M., Bera T.K., and Ghosh Debidas. (2011). Antidiabetic Potentially of the Aqueous Methanollic Extract of Seed of *Swieteniamahagoni* (L) Jacq. In Streptozotocin-Induced Diabetic Male Albino Rat: A Correlative and Evidence-Based Approach with Antioxidative

- and Antihyperlipidemic Activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. (2011).
- [33] Ceriello A. (2003). New Insights on Oxidative Stress and Diabetic Complications May Lead to a Casual Antioxidant Therapy. *Diabetes Care*. 26. 1589-1596.
- [34] Winarsi, H., Sasongko, N.D., Purwanto, A., dan Nuraeni, I. (2013). Ekstrak Daun Kapulaga Menurunkan Indeks Atherogenik dan Kadar Gula Darah Tikus Diabetes Induksi Alloxan. *Journal of Agritech*. 33(3).
- [35] Punitha, I.S., Rajendran, K., Shirwaikar, A., dan Shirwaikar, A. (2005). Alcoholic Stem Extract of *Coscinium Fenestratum* Regulates Carbohydrate Metabolism and Improves Antioxidant Status in Streptozotocinnicotinamide Induced Diabetic Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Journal*. 2. 375-381.
- [36] Marineli, Rafaela da Silva, Anne y Castro Marques, Cibeles Priscila Busch Furlan, and Mario Roberto Marostic Jr. (2012). Antioxidant Effects of the Combination of Conjugated Linoleic Acid and Phytosterol Supplementation in *Sprague-Dawley* Rats. *Food Research International Journal*. 49(2012). 487-493.
- [37] Choi, Jung-Min, Eun-Ok Lee, Hyo-Jung Lee, Kwan-Hyun Kim, Kyoo-Seok Ahn, Bum-Sang Shim, Nam-Il Kim, Myoung-Chong Song, Nam-In Baek, and Sung-Hoon Kim. (2007). Identification of Campesterol from *Chysanthemum coronarium* L. and its Antiangiogenic Activities. *Phytotherapy Research*. (21). 954-959.
- [38] Goud, B.J., Dwarakanath V., and B.K. Chikka Swamy. (2015). Sterptozotocin– A Diabetogenic Agent in Animal Models. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research*. 3(1). 253-269.

- [39] Weber C, Pernis B, Ting W, Rosenkrantz K, and Reemtsma K. (1984). Murine Streptozotocin Diabetes: Influences of the Major Histocompatibility Complex, Genetic Background, and Blood Transfusion. *Diabetologia*. 160–162.
- [40] Schnedl, W.J., Ferber S., Johnson J.H., and Newgard C.B. (1994). STZ Transport and Cytotoxicity: Specific Enhancement in GLUT2-Expressing Cells. *Diabetes Journal*, 43. 1326-1333.
- [41] Szkudelski, T. (2001). The Mechanisme of Alloxan and Streptozotocin Action in β Cells of the Rat Pancreas. *Physiological Research*. 50(6). 536-546.
- [42] Suryani, Nany, Tinny Endang H., dan Aulanni'am. (2013). Pengaruh Ekstrak Metanol Biji Mahoni terhadap Peningkatan Kadar Insulin, Penurunan Ekspresi TNF- α dan Perbaikan Jaringan Pankreas Tikus Diabetes. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 27(3).
- [43] Zulkarnain. (2013). Perubahan Kadar Glukosa Darah Puasa pada Tikus *Sprague dawley* yang Diinduksi Streptozotocin Dosis Rendah. *Jurnal kedokteran Syiah Kuala*. 13(2).
- [44] Lenzen S. (2008). The Mechanisms of Alloxan and Streptozotocin Induced Diabetes. *Diabetologia*. 51. 216-226.
- [45] Mordes J.P., Bortell R., Blankenhorn E.P., Rossini A.A., and Greiner D.L. (2004). Rat Model Type 1 Diabetes: Genetics, Environment and Autoimmunity. *ILAR Journal*. 45(3). 278-91.
- [46] Wiyadi. (2011). Kadar Testosteron Serum dan Caspase-3 Aktif Sel Leydig pada Tikus Jantan *Sprague Dawley* Diabetes Melitus Akibat Pemberian Suspensi Bubuk Kacang Kedelai Kuning (*Glycin max*). *Berkala Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran UGM*. 142(2). 65-72.

- [47] Parasuraman, S., Anish R., Subramani B., Selvadurai M., Kalaimani J.K., and Venugopal V. (2014). An Overview of Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy Instrumentation. *Pharmaceutical Methods Malaysia*. 5(2).
- [48] Suttiarporn, Panawan, Watcharapong Chumpolsri, Sugunya Mahatheeranont, Suwaporn Luangkamin, Somsuda Teepsawang, and Vijitra Leardkamolkarn. (2015). Structure of Phytosterols and Triterpenoids with Potential Anti-Cancer Activity in Brain of Black Non-Glutinous Rice. *Jurnal of Nutrients*. 7. 1672-1687.
- [49] Koirewoa, Y.A., Fatimawali, dan W.I. Wiyono. (2008). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dalam Daun Beluntas (*Pluchea indica L.*). Universitas Sam Ratulangi. 83-96.
- [50] De D, Chatterjee K., Ali K.M., Bera T.K., and Ghosh Debidas. (2011). Antidiabetic Potentially of the Aqueous Methanollic Extract of Seed of Swieteniamahagoni (*L*) Jacq. In Streptozotocin-Induced Diabetic Male Albino Rat: A Correlative and Evidence-Based Approach with Antioxidative and Antihyperlipidemic Activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. (2011).
- [51] Sunarsih, E.S., Djatmika, dan Utomo R.S. (2007). Pengaruh Pemberian Infusa Umbi Gadung (*Dioscorea hispida D.*) terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah Tikus Putih Jantan yang Diinduksi Aloksan. *Majalah Farmasi Indonesia*. 18(1). 29-33.
- [52] Winarsi, Hery. (2007). *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas: Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius.

